

环氧化物水解酶的研究进展

娄文勇^{1,2*}, 赵莹^{1,2}, 彭飞^{1,2}, 宗敏华^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 应用生物催化实验室, 广州 510640;

2. 华南理工大学, 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 广州 510640)

摘要:环氧化物水解酶可高效率、高选择性地水解环氧化物生成手性邻二醇, 对光学活性的邻二醇的合成和光学活性的环氧化物的制备具有重要意义. 文章阐述了环氧化物水解酶的作用、来源、结构及其催化机制, 进一步综述了环氧化物水解酶催化环氧化物水解、环氧化物水解酶的克隆表达等研究进展.

关键词:水解酶; 环氧化物; 邻二醇; 催化

中图分类号: Q556.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-5463(2017)06-0001-06

Research Progress on Epoxide Hydrolase

LOU Wenyong^{1,2*}, ZHAO Ying^{1,2}, PENG Fei^{1,2}, ZONG Minhua^{1,2}

(1. Laboratory of Applied Biocatalysis, School of Food Science and Engineering, South China University of Technology,

Guangzhou 510640, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and

Product Safety, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Epoxide hydrolases can highly and selectively catalyze epoxides to chiral diols, which is an effective way to synthesize chiral diols. This article introduces the structure, functions, sources and mechanism of catalysis of this enzyme. The research on the hydrolyzation of epoxides by epoxide hydrolases, the enzyme cloning and expression in other bacteria are summarized.

Key words: hydrolase; epoxide; chiral diol; catalysis

环氧化物通过选择性开环可以制备具有光学活性的手性醇类化合物及选择性保留具有重要价值的环氧化物. 如作为神经保护药关键性合成子的(R)-4-氯苯基乙二醇经环氧化物水解酶水解相应的环氧化物制备而得. 与之类似, 茛环类环氧化物经环氧化物水解酶催化开环水解也可以制得抗艾滋病药物齐夫而定的重要中间体物质:(1R,2S)-环氧化合物和(1R,2R)-二醇. 环氧化物水解酶广泛存在于自然界中, 在植物、动物、真菌和细菌中均存在环氧化物水解酶, 其催化环氧化物水解反应相比化学催化有诸多优点, 如选择性高、催化效率高、环境友好等, 因此引起了广泛关注. 然而, 从自然界筛选的环氧化物水解酶也存在一定的局限, 如理论产率不超过50%, 底物的耐受性较低, 酶提取纯化困难和酶表达量较低等缺点. 针对这些问题, 研究人员采

用了基因克隆表达及基因突变等技术有效地克服了这些困难.

1 环氧化物水解酶的来源

近年来, 光学纯的醇、氨基酸、胺、环氧化物和有机酸的制备成为研究的热点, 其中手性醇具有重要的应用价值^[1]. 1,2-苯乙二醇是一种手性醇, 因其烷基链上 α 位连有4个不同的化学基团而具有一定的旋光性. 目前, 像这种具有旋光性的手性醇被广泛用于医药领域、农药领域和材料领域. 光学纯的(S)-1,2-苯乙二醇因具有光学、热学和化学稳定性等特点不仅是液晶材料中重要的添加剂, 同时还可以作为农药的中间体; 而光学纯的(R)-1,2-苯乙二醇是制备具有光学活性的医用药物的重要中间

体,如进一步合成光学活性药物 β -肾上腺素阻断剂、(R)-硝基心定、抗心律失常药等^[2-4]。(R)-1,2-庚二醇是用于合成铁电液晶材料的 γ -内酯的前体^[5]。(2R,3S)-3-(4-甲氧基苯基)缩水甘油酸酯可用于合成抗癌药物氨基酶 N 抑制剂 Besattin、Phebetin、Porbestni 和 MR-387 等一系列化合物^[6]。(R)-苄基缩水甘油醚用于合成 Acetogenins 等免疫抑制剂^[7]。

环氧化物是合成手性醇的重要中间体,其立体选择性开环可得到手性环氧化物或手性醇化合物,并用于后续的应用。目前,环氧化物开环水解成手性醇的反应多集中在化学法和生物法^[8]。化学法常存在诸多不足,因为环氧化物在水中溶解性较差,需要添加有机溶剂,溶剂的消耗量比较大,步骤较繁琐,反应条件较苛刻,产品光学纯度低,而且反应中需要添加有毒的手性催化剂和保护剂^[9-10]。另外, Jacobsen 法虽然能水解外消旋环氧化物得到手性邻二醇和手性环氧化物,但其存在底物谱窄、反应条件苛刻、选择性低、产物分离纯化困难和环境污染等问题。与化学法相比,生物法利用酶或细胞作为催化剂,不仅具有催化效率高、选择性高、反应温和、污染小等优点,而且能够制备一些化学法难以合成的对映体纯的小分子手性邻二醇和手性环氧化物,因而生物法日益受到人们青睐,逐渐成为手性化合物制备的重要手段^[11-13]。

环氧化物水解酶是可将水分子选择性地加成至环氧环上,从而生成邻二醇类化合物的一种酶^[14],它还可通过水解人体内环氧化物从而降低人体患癌症的几率^[15]。在活细胞中,芳香族和脂肪族的环氧化物均可被环氧化物水解酶水解,获得二醇,取得解毒和信号调节作用。^[16-17]环氧化物水解酶的来源较为广泛,普遍存在于自然界的生物体中,几乎所检测过的哺乳动物体内都存在环氧化物水解酶。在土豆、绿豆、黄豆、香蕉及烟草等植物中均发现了该水解酶。另外,通过对微生物的研究也发现,该酶广泛存在于微生物体内,其主要微生物来源有 *Agrobacterium radiobacter*、*Arthrobacter spp.*、*Aspergillus niger*、*Bacillus megaterium*、*Beauveria Sulfurescens*、*Chryseomonas luteola*、*Corynebacterium spp.*、*Mycobacterium paraffinicum*、*Methylobacterium spp.*、*Nocardia spp.*、*Pseudomonas spp.*、*Rhodococcus erythropolis*、*Rhodospiridium toluloides*、*Rhodotorula glutinis*、*Streptomyces antibioticus*、*Trichosporon loubierii*、*Xanthophyllomyces dendrorhous* 等^[18]。

自 HECHTBERGER 等^[19]报道了利用来源于红球菌的环氧化物水解酶选择性地催化 1,2-环氧庚烷不对称水解生成相应的 R-二醇后,在水相中不同来源的环氧化物水解酶催化不同结构的环氧化物不对称水解的研究相继出现。21 世纪初,我国的研究人员在产环氧化物水解酶的菌株筛选方面做了大量工作。曲音波课题组从全国多地收集到的长期被石油、动物油或植物油污染的土壤或水样中分离得到一株产环氧化物水解酶类产碱假单胞菌,该菌可用于拆分苄基缩水甘油酸乙酯。研究发现,在添加吐温 60 的反应体系中,该菌全细胞催化的底物浓度可达 78 mmol/L,且产物的光学纯度达 98%,但产率较低(33%)^[20-21]。孙万儒课题组从土壤样品中筛选出一株产环氧化物水解酶的黑曲霉菌株^[22],利用该菌株催化外消旋环氧苯乙烷不对称水解,得到(R)-1,2-苯基乙二醇的光学纯度大于 99%,但随着反应时间的延长,底物的非酶水解严重,导致产物的光学纯度明显下降^[23]。许建和课题组从土壤中筛选出一株产环氧化物水解酶的巨大芽孢杆菌,该菌具有较高的对映体选择性,可选择水解(R)-缩水甘油苯基醚,对映体选择率 E 值高达 47.8%,可选择性地水解(R)-缩水甘油苯基醚^[24],后期他们还报道了绿豆中存在环氧化物水解酶的事实^[25]。国外同样也对产环氧化物水解酶的菌株进行了筛选研究。DUARAH 等^[26]从土壤里筛选到一株塔宾曲霉,该菌株具有反应速度快、选择性高等优点,反应 45 min 可将外消旋的环氧苯乙烷水解成光学纯度达 97%的(R)-苯乙二醇,且底物的转化率高达 99%。同时还研究了苯环上的氯取代对反应的影响,结果表明,取代后底物的转化率不受影响,但是产物的光学纯度以及反应时间受到严重影响。

2 环氧化物水解酶的结构与催化

目前,已发现的环氧化物水解酶可以分为以下几类:可溶性环氧化物水解酶、微粒体环氧化物水解酶、保幼激素环氧化物水解酶、胆固醇环氧化物水解酶、羟环氧烯酸水解酶、白三烯 A4 环氧化物水解酶以及柠檬烯环氧化物水解酶 7 个亚家族^[27-29]。

对比不同来源环氧化物水解酶的蛋白氨基酸序列发现,不同来源酶的氨基酸序列相似程度很高,且基本上都属于 α/β 折叠型的水解酶^[30],它们具有三位一体的结构^[31],1 个电荷中继网和亲核基团共同组成了催化三联体。活性位点由核心结构和帽子结构组成,核心结构由 2 个天冬氨酸残基和 1 个组氨

酸残基构成^[32-33]。目前接受程度较高的催化机理为:先由酶的帽子结构中2个酪氨酸残基将环氧化物中的1个O原子质子化,再经酶的1个天冬氨酸残基进攻该部分被质子化的环氧化物,形成1个共价结合的中间体,然后落入酶活性中心的1个水分子受到组氨酸残基和另一个天冬氨酸残基的活化,失去1个质子,形成1个羟基,该羟基进而进攻乙二醇-单酯-酶中间体,酪氨酸被还原,环氧化物被水解生成二醇^[33]。然而,不同类型和不同来源的环氧化物水解酶的蛋白相对分子质量大小却明显不同,哺乳动物的可溶性环氧化物水解酶是由2个62 kDa单体结构组成的同型二聚体,而来源于植物的可溶性环氧化物水解酶一般以单体或二聚体蛋白的形式存在,其相对分子质量为35 kDa左右^[33-34]。微粒体环氧化物水解酶的相对分子质量约50 kDa^[35],而羟环氧化物烯酸水解酶和白三烯A4环氧化物水解酶的相对分子质量分别为53 kDa和70 kDa。

环氧化物水解酶可以高效催化环氧化物水解并生成邻二醇,这也引起了研究人员对该酶催化反应条件的探索。姜文勇课题组先后研究了来源于绿豆和黄豆的环氧化物水解酶的催化特性^[32,36-40]。在2012年,该课题组陈文静^[32]利用从绿豆中提取的环氧化物水解酶催化环氧苯乙烷。由于环氧苯乙烷在水相中(特别是在高底物浓度情况下)易水解的性质,建立了在磷酸缓冲液体系中,底物浓度为5 mmol/L的绿豆环氧化物水解酶高效催化环氧苯乙烷的反应体系。在这个体系里,催化终止时可获得(R)-1,2-苯乙二醇的对映体过量率高达92.6%,且产率高达47.6%。为解决水相体系中催化反应时底物浓度较低的问题,随后研究了在有机溶剂-缓冲液双相反应体系中绿豆环氧化物水解酶催化环氧苯乙烷,选取6种有机溶剂构建双相催化体系,分别是乙酸乙酯、三氯甲烷、环己烷、正己烷、辛烷和癸烷。采用这6种有机溶剂-缓冲液双相反应体系,利用绿豆环氧化物水解酶催化环氧苯乙烷生成(R)-1,2-苯乙二醇,对比研究了这6种有机溶剂体系中反应的对映体过量率、产率以及有机溶剂对酶活性的影响。结果表明,乙酸乙酯和三氯甲烷对绿豆环氧化物水解酶的毒性较大,易使酶失活。进一步研究底物和产物在双相体系的分配系数发现,所选取的有机溶剂对底物都具有较好的萃取效果,反应体系的底物浓度得到了一定程度的提高,表明在所选取的有机溶剂-缓冲液体系中可以有效解除底物对酶的毒性。综合酶在6种双相反应体系中的催化结果以及底物的分配情况,最终确定正己烷-缓冲液体

系为进一步研究的催化反应体系。经过催化反应条件的优化后,最终底物浓度有效提高4倍,且产率和对映体过量率也有提高,分别为49.2%和94.3%。

离子液体作为一种替代有机溶剂的绿色溶剂,具有低毒、难挥发、呈液态的温度范围大、生物相容性好的特点,在催化领域表现出较好的应用前景。用疏水性离子液体替代有机溶剂,构成疏水性离子液体-缓冲液双相体系,研究绿豆环氧化物水解酶在此类双相体系中的催化性能。在所研究的9种疏水性离子液体中, $C_4MIM \cdot PF_6$ 对绿豆环氧化物水解酶的生物相容性最好,可以较好地保留酶的活性,经过处理后,活性仍保留85.5%。进一步优化该反应体系的反应条件后,所得产物的产率和对映体纯度均有提高,分别为49%和97%,证明离子液体可用于催化体系中提高环氧化物水解酶的催化性能^[36]。进一步研究发现,亲水性离子液体可以促进环氧化物水解酶的活力,其中 $C_2OHMIM \cdot BF_4$ 和 $C_2OHMIM \cdot TfO$ 对该酶的毒性较低,且 $C_2OHMIM \cdot BF_4$ 能有效提高酶的催化速度^[32]。

酶的固定化技术有利于提高酶的稳定性,固定化酶可以重复使用并容易与反应体系分离,降低了产物的纯化难度。本课题组于春杨等^[37-38]使用戊二醛作交联剂,形成绿豆环氧化物水解酶交联聚体,该酶聚集体的酶活性回收率达到92.5%,且重复使用4次后,仍保留有原始酶活性的85%以上。进一步研究酶聚集体现在正己烷-缓冲液双相体系中催化环氧苯乙烷发现,该酶聚集体的活性明显较游离酶的活性高,大大缩短了催化的时间(由20 h缩短至6 h),这也说明该种固定化方法能有效提高酶的稳定性。黄豆也被证实具有环氧化物水解酶,本课题组岳东梅等^[39-40]从黄豆中提取出环氧化物水解酶(SEH),并成功地将其固定在金属有机框架材料 $UiO-66-NH_2$ 中,制备出 $SEH@UiO-66-NH_2$ 固定化酶。考察在水相缓冲液体系,添加深度共熔溶剂作助溶剂时发现, $SEH@UiO-66-NH_2$ 在含氯化胆碱:尿素的缓冲液体系中,利用1,2-环氧辛烷作底物可选择性制备(R)-1,2-辛二醇,产率和产物光学纯度可以达到40.29%和80.52%。

3 环氧化物水解酶的克隆表达及其突变

环氧化物水解酶因其野生菌株表达量较低、菌体培养周期长、或从其它来源提取酶的过程复杂且酶的纯度较低等缺点,不少研究人员将环氧化物水解酶的基因在大肠杆菌中进行克隆表达,以获得高

表达环氧化物水解酶的工程菌,并可使工程菌内的目的基因进一步突变,从而得到更高效的环氧化物水解酶.另外,又因环氧化物水解酶只能高选择性水解对映体中的一种环氧化物,这样会造成产物的理论产率不超过50%的现象.为了进一步提升产物的产率,研究人员将可以水解不同构型底物但能生成相同构型产物的环氧化物水解酶的基因克隆表达于同一工程菌中,以提高产物的产率,突破理论上产率不超过50%的限制.

HWANG等^[41]报道了一株产环氧化物水解酶的 *Caulobacter crescentus* 菌株,该菌株所产生的环氧化物水解酶能将外消旋的对氯环氧苯乙烷不对称水解成 R 型的邻二醇,将该环氧化物水解酶的基因克隆表达于其它细胞中,该细胞在产物浓度大于 40 mmol/L 时,存在较明显的产物抑制作用.后续又进行了一个制备级的规模实验,在底物质量浓度为 16.8 g/L 时,催化终止时可获得高纯度、高产率的产物,对映体纯度为 95%,产率为 72%.贺婉红^[42]对来源于绿豆环氧化物水解酶的基因进行克隆表达,先提取出编码该酶的 mRNA,再通过反转录合成 cDNA,然后扩增成双链的 DNA,将该 DNA 在大肠杆菌中进行克隆表达,获得了产绿豆环氧化物水解酶的工程菌株,同时评价了该工程菌株产的绿豆环氧化物水解酶的酶学性质.该酶的米氏常数为 2.05 mmol/L,最大反应速率为 14.8 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$.JIN等^[43]发现一株 *Agrobacterium radiobacter* 菌株,该菌株具有编码环氧化物水解酶的基因,所编码的水解酶能高效且特异性地拆分外消旋 3-氯-1,2-环氧丙烷.通过将该环氧化物水解酶的目的基因成功克隆表达于大肠杆菌,进一步研究了重组工程菌动力学拆分 3-氯-1,2-环氧丙烷的性能.结果表明,重组后的大肠杆菌对 3-氯-1,2-环氧丙烷的两种对映体均有较好的水解能力,但由于 S 构型的对映体对酶的亲和力较强,催化过程会优先水解 S 型的环氧化物对映体,从而保留 R 型的环氧化物对映体.然而,当 S 型底物被消耗殆尽后,R 型的环氧化物水解加快,导致 R 型底物的产率下降,因此催化时间的控制对该拆分反应尤为重要.此外,由于底物和产物的抑制作用,当底物浓度为 384 mmol/L 时,尽管延长反应时间,最终获得的 R 型 3-氯-1,2-环氧丙烷的光学纯度也明显下降.在所验证的重组菌菌量的范围内,光学纯度不超过 61%.为进一步提升底物浓度,通过分批添加底物和使用双相反应体系来降低底物的抑制作用.在分批添加底物时,最终添加底物的尝试浓度为

448 mmol/L,可获得目标产物的光学纯度超过 80%,而在环己烷-缓冲液双相反应体系中,底物的最终添加浓度为 512 mmol/L,目标产物的光学纯度大于 98%.

来源于 *Bacillus megaterium* ECU1001 的环氧化物水解酶的结构与其它来源的水解酶的结构相似,均含有 α 和 β 结构,且含有 1 个覆盖活性位点的盖子.KONG等^[44]成功将该菌株的环氧化物水解酶的目的基因克隆表达于大肠杆菌,但来源于该野生菌株的环氧化物水解酶的产物释放通道较窄,限制了酶的催化速率.通过对释放通道附近的氨基酸(如第 128 位和第 145 位氨基酸)进行突变,有效拓宽了产物的释放通道,提升了酶的催化速率.

环氧化物选择性水解或拆分受限于理论产率不超过 50%,通过将选择性不同的两种或多种酶克隆表达于 1 个工程菌中,可有效突破这一限制.KIM等^[45]通过将来源于新月柄杆菌和鲮鱼的环氧化物水解酶基因同时克隆表达于大肠杆菌中,从而实现了对外消旋环氧苯乙烷的催化水解,生成 R 型邻二醇的产率超过 50%,产物光学纯度高达 94%,且底物浓度较高,达到 50 mmol/L.CAO等^[46]将来源于土豆和 *Agrobacterium radiobacter* 的环氧化物水解酶的基因表达于大肠杆菌中,该菌可将廉价易得的环氧苯乙烷选择性地水解为 (R)-1,2-型苯乙二醇,在底物浓度为 5 mmol/L 时,其转化率高达 100%且产物的光学纯度高达 98%.

4 结论与展望

环氧化物水解酶的来源广泛,普遍存在于自然界的植物和微生物中,较易获得.在水相和非水相反应体系中(如:有机溶剂-缓冲液双相体系、含离子液体反应体系等),环氧化物水解酶均表现出优异的催化选择性,且酶催化三联体结构清晰.但是,由于环氧化物难溶于水或易水解的性质,限制了该催化反应在水相体系中的应用,而在非水相反应体系中催化环氧化物水解可有效克服这些问题,提升催化的效率.分子生物学技术的应用促进了环氧化物水解酶的研究进展,其可以用来获得不同来源的环氧化物水解酶,研究酶的酶学性质,以及对自然来源酶的改造,获得更加高效的环氧化物水解酶或重组工程菌.

探索绿色且有利于环氧化物溶解的反应介质是建立高效催化环氧化物反应体系的关键一环,深度

共熔溶剂也已证明可用于土豆环氧化物水解酶的催化反应,提高酶对底物的选择性,但其它来源的环氧化物水解酶在该类介质中反应的研究并不多.随着生物技术的发展,利用基因工程技术改造原有的环氧化物水解酶,提升其催化的选择性、活力以及底物的耐受力,也逐渐成为主要发展趋势.

参考文献:

- [1] 刘荣仕. 树脂原位吸附提高全细胞不对称制备(S)-苯基乙二醇催化效率研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [2] JANSSEN A J M, KLUNDER A H, ZWANENBURG B. PPL-catalyzed resolution of 1,2- and 1,3-diols in methyl propionate as solvent. An application of the tandem use of enzymes[J]. *Tetrahedron*, 1992, 23(1): 7409-7416.
- [3] KATAOKA M, KITA K, WADA M, et al. Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2003, 62(5/6): 437-445.
- [4] SCHMID A, DORDICK J S, HAUER B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow[J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 258-268.
- [5] SOLARES F L, MATEO C. Improvement of the epoxide hydrolase properties for the enantioselective hydrolysis of epoxides[J]. *Current Organic Chemistry*, 2013, 17(7): 744-755.
- [6] BALA N, CHIMNI S S. Recent developments in the asymmetric hydrolytic ring opening of epoxides catalysed by microbial epoxide hydrolase[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2010, 21(24): 2879-2898.
- [7] BALA N, KAUR K, CHIMNI S S, et al. Bioresolution of benzyl glycidyl ether using whole cells of *Bacillus alcalophilus*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(4): 383-389.
- [8] HWANG S, CHOI C Y, LEE E Y. Bio- and chemo-catalytic preparations of chiral epoxides[J]. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*, 2010, 16(1): 1-6.
- [9] BHARATHI B, RANJAN M, RICHARDSON D E. Osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation by carbon dioxide-activated hydrogen peroxide and N-methylmorpholine[J]. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(6): 1071-1075.
- [10] CHOI D S, HAN S S, KWUEON E K, et al. New mono-quaternized bis-cinchona alkaloid ligands for asymmetric dihydroxylation of olefins in aqueous medium: unprecedented high enantioselectivity and recyclability[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 38(19): 2560-2564.
- [11] NIE Y, XIAO R, XU Y, et al. Novel anti-prelog stereospecific carbonyl reductases from *Candida parapsilosis* for asymmetric reduction of prochiral ketones[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2011, 9(11): 4070-4078.
- [12] TIAN X, ZHENG G W, LI C X, et al. Enantioselective production of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol from dicarboxyesters by recombinant *Bacillus subtilis* esterase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73(1): 80-84.
- [13] ZHU D, YANG Y, MAJKOWICZ S, et al. Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via substrate-enzyme docking-guided point mutation[J]. *Organic Letters*, 2008, 10(4): 525-528.
- [14] 鞠鑫, 潘江, 许建和. 绿豆环氧水解酶催化对硝基苯乙烯氧化物的对映归一性水解[J]. *催化学报*, 2008, 29(8): 696-700.
- [15] JU X, PAN J, XU J H. Enantioconvergent hydrolysis of *p*-Nitrostyrene oxide catalyzed by Mung bean epoxide hydrolase[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2008, 29(8): 696-700.
- [16] 赵晶. 环氧水解酶的克隆表达和催化性能研究[D]. 上海:华东理工大学,2011.
- [17] WEIJERS C A G M. Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1997, 8(4): 639-647.
- [18] OESCH F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds[J]. *Xenobiotica: the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 1973, 3(5): 305-340.
- [19] 江克翊. 微生物产环氧化物水解酶的筛选及对苯基缩水甘油醚的动力学拆分研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2009.
- [20] HECHTBERGER P, WIRNSBERGER G, MISCHITZ M, et al. Asymmetric hydrolysis of epoxides using an immobilized enzyme preparation from *Rhodococcus sp*[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1993, 4(6): 1161-1164.
- [21] 李从发. 新型环氧化物水解酶筛选及其在手性合成中的应用[D]. 济南:山东大学,2003.
- [22] LI C, LIU Q, SONG X, et al. Epoxide hydrolase-catalyzed resolution of ethyl 3-phenylglycidate using whole cells of *Pseudomonas sp*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(24): 2113-2116.
- [23] 沙倩, 杨柳, 王建军, 等. 产环氧化物水解酶的黑曲霉菌种分离和发酵条件的研究[J]. *菌物学报*, 2001, 20(4): 494-502.
- [24] SHA Q, YANG L, WANG J J, et al. Isolation and fermentation conditions of *aspergillus niger* capable of production epoxide hydrolysis[J]. *Mycosystema*, 2001, 20(4): 494-502.
- [25] LIU Y, SHA Q, WU S, et al. Enzymatic resolution of racemic phenyloxirane by a novel epoxide hydrolase from *As-*

- pergillus niger* SQ-6 and its fed-batch fermentation[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(4):274-282.
- [24] 唐燕发,许建和,武慧渊,等. 高对映选择性环氧化物水解酶产生菌的筛选及特性研究[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5):14-17.
- TANG Y F, XU J H, WU H Y, et al. Isolation and characterization of an epoxide hydrolase producer for enantioselective hydrolysis of (R,S)-phenyl glycidyl ether[J]. *Microbiology China*, 2001, 28(5):14-17.
- [25] XU W, XU J H, PAN J, et al. Enantioconvergent hydrolysis of styrene epoxides by newly discovered epoxide hydrolases in Mung bean[J]. *Organic Letters*, 2006, 8(8):1737-1740.
- [26] DUARAH A, GOSWAMI A, BORA T C, et al. Erratum to: enantioconvergent bihydrolysis of racemic styrene oxide to R-phenyl-1,2-ethanediol by a newly isolated filamentous fungus *aspergillus tubingensis* TF1[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2013, 171(1):261.
- [27] MORISSEAU C, HAMMOCK B D. Epoxide hydrolases; mechanisms, inhibitor designs, and biological roles[J]. *Cheminform*, 2005, 45(39):311-333.
- [28] SMIT M S. Fungal epoxide hydrolases; new landmarks in sequence-activity space[J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(3):123-129.
- [29] 彭华松,宗敏华,聂凌鸿. 环氧化合物水解酶的研究进展[J]. *分子催化*, 2003, 17(1):75-80.
- [30] JANSSEN D B, PRIES F, VAN D P J, et al. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the dh1a gene[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(12):6791-6799.
- [31] CHOI W J, CHOI C Y. Production of chiral epoxides: epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective hydrolysis[J]. *Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2005, 10(3):167-179.
- [32] 陈文静. 绿豆环氧化物水解酶催化环氧苯乙烯不对称水解反应[D]. 广州:华南理工大学, 2012.
- [33] 盛艳旻. 环氧化物水解酶产生菌的筛选及其发酵条件和对苯基缩水甘油醚类化合物拆分条件的研究[D]. 杭州:浙江工业大学, 2010.
- [34] BEETHAM J K, TIAN T, HAMMOCK B D. cDNA cloning and expression of a soluble epoxide hydrolase from human liver[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1993, 305(1):197-201.
- [35] SCHLADT L, THOMAS H, HARTMANN R, et al. Human liver cytosolic epoxide hydrolases[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 176(3):715-723.
- [36] CHEN W J, LOU W Y, ZONG M H. Efficient asymmetric hydrolysis of styrene oxide catalyzed by Mung bean epoxide hydrolases in ionic liquid-based biphasic systems[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 115(115):58-62.
- [37] 于春杨. 绿豆环氧化物水解酶交联酶聚体的制备、表征及应用[D]. 广州:华南理工大学, 2013.
- [38] YU C Y, LI X F, LOU W Y, et al. Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 166(1/2):12-19.
- [39] 岳东梅. 金属有机框架材料(MOFs)的制备及其固定化黄豆环氧化物水解酶的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2015.
- [40] CAO S L, YUE D M, LI X H, et al. Novel Nano-/micro-biocatalyst: soybean epoxide hydrolase immobilized on UiO-66-NH₂ MOF for efficient biosynthesis of enantiopure (R)-1,2-Octanediol in deep eutectic solvents[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(6):3586-3595.
- [41] HWANG S, CHOI C Y, LEE E Y. Enantioconvergent bioconversion of *p*-chlorostyrene oxide to (R)-*p*-chlorophenyl-1,2-ethanediol by the bacterial epoxide hydrolase of *Caulobacter crescentus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(7):1219-1225.
- [42] 贺婉红. 绿豆环氧水解酶基因克隆、表达及酶学性质表征[D]. 上海:华东理工大学, 2010.
- [43] JIN H X, LIU Z Q, HU Z C, et al. Biosynthesis of (R)-epichlorohydrin at high substrate concentration by kinetic resolution of racemic epichlorohydrin with a recombinant epoxide hydrolase[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2013, 13(4):385-392.
- [44] KONG X D, YUAN S, LI L, et al. Engineering of an epoxide hydrolase for efficient bioresolution of bulky pharmacological substrates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(44):15717-15722.
- [45] KIM H S, LEE O K, HWANG S, et al. Biosynthesis of (R)-phenyl-1,2-ethanediol from racemic styrene oxide by using bacterial and marine fish epoxide hydrolases[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(1):127-133.
- [46] CAO L, LEE J, CHEN W, et al. Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2006, 94(3):522-529.